

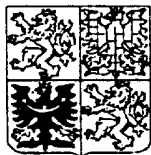
PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

283 352

(19)

ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **1613-94**

(22) Přihlášeno: **01. 07. 94**

(30) Právo přednosti:
02. 07. 93 US 93/088033

(40) Zveřejněno: **18. 01. 95**
(Věstník č. 1/95)

(47) Uděleno: **12. 01. 98**

(24) Oznámeno udělení ve Věstníku: **18. 03. 98**
(Věstník č. 3/98)

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.⁶:
A 61 K 38/48

(73) Majitel patentu:

Immuno AG, Wien, AT;

(72) Původce vynálezu:

Eibl Johann dr., Wien, AT;

Pichler Ludwig prof., Wien, AT;

Schwarz Hans-Peter doc., Wien, AT;

(74) Zástupce:

Guttmann Michal JUDr. ing., Na křivce 23,
Praha 10, 10100;

(54) Název vynálezu:

**Použití lys-plasminogenu pro přípravu
farmaceutické kompozice**

(57) Anotace:

Lys-plasminogen je možno použít pro přípravu farmaceutické kompozice pro ošetření reperfuzního poškození a pro zlepšení mikrocirkulace. Uvedená farmaceutická kompozice je vhodná i pro ošetření cerebrální ischemie a transitorních ischemických ataků. Dále je taková farmaceutická kompozice vhodná pro prevenci reperfuzního poškození u pacientů, přijímajících transplantovanou tkáň nebo orgán, a pro ošetřování reperfuzního poškození u dárce tkáně nebo orgánu.

CZ 283 352 B6

Použití lys-plasminogenu pro přípravu farmaceutické kompozice

Oblast techniky

5

Předložený vynález se týká použití lys-plasminogenu pro přípravu farmaceutické kompozice pro prevenci a léčbu reperfučního poškození, vzniklého z ischemických příhod.

10 Dosavadní stav techniky

Mrtvice zůstává třetí nejobvyklejší příčinou úmrtí v industrializovaném světě, za ischemickou srdeční chorobou a rakovinou. Mrtvice jsou odpovědné za asi 300 000 úmrtí ročně ve Spojených státech a asi za 11 000 úmrtí ročně v Rakousku. Mrtvice jsou také hlavní příčinou příjmů do nemocnic a dlouhodobých neschopností. V souladu s tím je socioekonomický dopad mrtvice a s ní spojené zatížení společnosti prakticky neměřitelné.

"Mrtvice" je definována Světovou zdravotnickou organizací jako rychle se vyvíjející klinický znak místní nebo globální poruchy cerebrální funkce se symptomy, trvajících alespoň 24 hodin. Mrtvice jsou také zahrnuty v úmrtích, která nejsou zjevně způsobena jinak než vaskulárně.

Mrtvice jsou typicky způsobeny blokací nebo okluzí krevních cév k mozku nebo v mozku, při kompletní okluzi uzavření cerebrální cirkulace působí zastavení neuronální elektrické aktivity během sekund. V několika málo minutách po poškození energetického stavu a iontové homeostasis se objevují deplece vysokoenergetických fosfátů, selhání membránové iontové pumpy, odtok celulárního draslíku, přítok chloridu sodného a vody a membránová depolarizace. Jestliže okluze přetrvává více než pět až deset minut, dochází k nevratnému poškození. S neúplnou ischemií je obtížné hodnocení a závisí na zbytkové perfuzi a dostupnosti kyslíku. Po trombotické okluzi cerebrálních cév je ischemie vzácně úplná. Určitá zbytková perfuze obvykle přechovává v ischemické ploše, v závislosti na kolaterálním krevním toku a místním perfuzním tlaku.

Cerebrální krevní tok může kompenzovat poklesy v průměrném arteriálním krevním tlaku od 90 do 60 mm Hg autoregulací. Tento fenomen zahrnuje dilataci ve směru toku zbylých cév. Pod nižší hladinou autoregulace (asi 60 mm Hg) je vasodilatace neadekvátní a cerebrální krevní tok klesá. Mozek má však perfuzní rezervy, které mohou kompenzovat pokles v cerebrálním mozковém poklesu. Tato rezerva existuje protože za normálních podmínek pouze asi 35 % kyslíku doručovaného krví je extrahováno. Proto zvýšená extrakce kyslíku může nastat za předpokladu, že existuje normoxia a normocapnea. Jestliže distální krevní tlak klesá pod přibližně 30 mm Hg jsou dva kompenzační mechanismy (autoregulace a perfuzní rezerva) jsou neadekvátní pro zabránění selhání doručení kyslíku.

Jak klesá tok pod ischemický práh 23 ml/100 g/minuta, vyvíjejí se symptomy tkáňové hypoxie. Některé ischemie mohou být letální. Jestliže je ischemie zmírněna, povede k "penumbře". V neurologickém kontextu se penumbra týká zóny mozkové tkáně s moderovanou ischemií a paralyzuje neuronální funkci, která je reverzibilní s restaurací adekvátní perfuze. Penumbra vytváří zónu kolaterálně perfundované tkáně, obklopující jádro ischemie, ve kterém se vyvinul infarkt. Jinými slovy je penumbra tkáňová plocha, která může být chráněna a je v podstatě stavem mezi životem a smrtí.

50

Jestliže je sraženina degradována a krevní tok do penumbry je obnoven, může se objevit fenomen známý jako reperfuční poškození. Části poškozené tkáně v penumbře mohou být usmrceny nebo dále poškozeny obnoveným vstupem kyslíku nebo jiných substancí do plochy ovlivněné ischemií. Z hlediska tohoto fenoménu je rozsah tkáňového poškození vzniklého

z ischemie determinován jak dobou vyžadovanou pro dosažení otevření okludovaných cév a sériemi reakcí, které jsou výsledkem reperfuze a obnovením vstupu kyslíku k ovlivnění tkáně.

I když se ischemický případ může objevit kdekoli ve vaskulárním systému, jsou vidlice arteria carotis a počátek vnitřní arteria carotis nejčastějšími místy trombotických okluzí cerebrálních krevních cév, které vedou k cerebrální ischemii. Symptomy sníženého krevního toku způsobené stenózou nebo trombózou jsou podobné symptomům vyvolaným chorobou cerebrální arterie. Průtok oftalmickou arterií je často dostatečně ovlivněn pro projev amaurosis fugax nebo transientní monokulární slepoty. Některé stenózy bilaterální interní arteria carotis mohou vést k cerebrální hemisférické hypoperfuzi. Tato se projevuje akutní ipsilaterální bolestí hlavy v akutní ischemické hemisféře. Okluze nebo snížení krevního toku se vzniklou ischemií jedné anterior cerebrální arterie distálně k anterior komunikační arterii poskytuje motorické a kortikálně senzorycké symptomy v kolaterální noze a méně často proximální paži. Jiné projevy okluzí nebo podperfuzí anterior cerebrální arterie zahrnují krokovou ataxii a současně urinární inkontinenci způsobenou poškozením parasagitálního frontálního laloku. Poruchy řeči projevující se jako snížení spontánní řeči může obecně být v souvislosti s potlačením psychomotorické aktivity.

Nejvíce ischemických mrtvic zahrnuje části nebo celou oblast střední cerebrální arterie s embolií srdce nebo extrakraniálních arterií carotis ve většině případů. Embolie může okludovat hlavní kmen střední cerebrální arterie, ale nejčastěji produkuje distální okluzi buď superior, nebo inferior větvi. Okluze superior větve působí slabost a ztrátu citlivosti, které jsou největší ve tváři a paži. Okluze posterior cerebrální arterie distálně k jejím penetrujícím větvím působí kompletní kontralaterální ztrátu vidění. Potíže při čtení (dyslexie) a při počítání (dyscalculie) mohou následovat ischemií dominantní posterior cerebrální arterie. Proximální okluze posterior cerebrální arterie působí ischemií větví penetrujících do calamických a limbických struktur. Klinické výsledky jsou hemisenzorycké poruchy, které mohou chronicky přecházet na intraktabilní bolest defektního místa (thalamická bolest).

Významný případ cerebrální ischemie je znám jako transientní ischemický atak ("TIA"). TIA je definován jako neurologický deficit s trváním menším než 24 hodin. TIA je důležitým signálem vývoje ischemie, která může vést k cerebrálnímu infarktu. V současnosti neexistuje žádná ideální léčba TIA a nejsou ani obecně přijatá pravidla, které léčebné nebo chirurgické procedury by měly být provedeny za účelem snížení výskytu mrtvice u subjektů s TIA.

Etiologie TIA zahrnuje hemodynamické případy a tromboembolický mechanismus. Protože TIA mizí během jedné hodiny, je deficit, který je většinou delší často klasifikován jako presumptivní mrtvice a je v souladu s tím, spojen s trvalým poškozením mozku. Proto se používá počítačová tomografie mozku pro výzkum cerebrálního infarktu v plochách ovlivněných TIA, trvajících déle než několik hodin. Souhrnně relevantním klinickým rozdílem mezi TIA a mrtvicí je, že ischemie způsobila poškození mozku, které je typicky klasifikováno jako infarktová nebo ischemická nekróza. Subjekty se zhoršenými klinickými znaky by mohly mít vyvíjející se mrtvici nebo jsou klasifikovány jako mající progresivní mrtvici. V tomto klinickém třídění je propagace sraženiny možným důležitým faktorem v progresi choroby.

Existuje obrovské množství chorob způsobených nebo spojených s ischemií. Verterobasilární ischemie je výsledkem okluze vertebrální arterie. Okluze vertebrální arterie a interference s tokem ipsilaterální posterior inferior cerebrální arterií působí laterální medulární syndrom, který má symptomologii zahrnující vertigo, nauseu, dávící nystagmus, ipsilaterální ataxii a ipsilaterální Hernerův syndrom. Verterobasilární ischemie často produkuje multifokální léze rozptýlené na obou stranách mozkového kmene podél značné délky. Nevezme-li se v úvahu cerebrální infarkt a laterální medulární syndrom, jsou klinické syndromy diskretních lézí tak zřídka zřejmé v čisté formě. Vertebrobasilární ischemie se projevuje různými kombinacemi

symptomů jako jsou závratě, obvykle vertigo, diplopia, faciální slabost, ataxia a znaků dlouhých nervů.

Okluze basilární arterie produkuje masivní deficity. Jeden z těchto deficitů je znám jako "uzavřený ve stavu" (locked in state). Za těchto podmínek paralýza limbů a většiny bulbárních svalů umožňuje subjektu pouze aby byl schopen komunikovat pohybem očí nebo očních víček podle kodu. Okluze basilárního apexu nebo horní části basilaru je obvykle způsobena embolií, která uzavírá spojení mezi basilární arterií a dvěma posterior cerebrálními arteriemi. Stav počíná snížením probuzení následovaným slepotou a amnesií způsobenou přerušením toku do posterior cerebrálních arterií jako i abnormalitami vertikálního pohledu a pupilární reaktivity díky segmentálnímu poškození.

Venozní okluze může působit masivní poškození a smrt. Tato choroba je méně obvyklá než arteriální cerebrální vaskulární choroba. Jako u ischemické mrtvice způsobené arteriální chorobou, je primárním mechanismem mozkového poškození snížení kapilárního krevního toku, v tomto případě způsobeného zvýšenou rezistencí odtoku z blokových vén. Zpětná transmise vysokého tlaku do kapilárního lože obvykle vede k počátku botání mozku edémem a hemoragickému infarktu v subkortikální bílé hmotě. Největšího poškození způsobeného venozní chorobou se dosáhne je-li okludován superior sagitální sinus. Venozní okluze se projevuje ve spojení s koagulačními poruchami, často v purpurální periodě nebo u subjektů s rozestými rakovinami nebo nakažlivými chorobami. Jestliže není započato s antikoagulační terapií, má okluze superior sagitálního sinu mortalitu 25 až 40 %.

Krátká difuze cerebrální ischemie může působit synkopu bez jakékoliv permanentní následné choroby. Prolongovaná difuze ischemie v jiných orgánech má devastující následky. Nejběžnějším případem je srdeční asystola nebo jiná kardiopulmonární selhání, včetně infarktu. Disekce aorty a globální hypoxie nebo otrava oxidem uhelnatým mohou působit podobné obrazy. Difuze hypoxie/ischemie typicky zabíjí neurony v hippocampu, cerebelární Purkyňovy buňky, striatum nebo kortikální vrstvy. Klinicky taková difuze hypoxie/ischemie vede k bezvědomí a ke komatu, následovaným v mnoha případech chronickým vegetativním stavem. Jestliže se subjekt z bezvědomí neprobere během několika málo dní, je prognóza návratu nezávislých mozkových funkcí velmi špatná.

Hyperviskozitní syndrom je další chorobou spojenou s průtokem krve a ischemií. Cerebrální krevní tok je v převráceném vztahu k viskozitě krve. Tato je přímo úměrná počtu cirkulujících červených a bílých buněk, agregačním stavu, počtu destiček a koncentraci plasmového proteinu. Krevní tok je nepřímě úměrný deformabilitě erythrocytů a krevní rychlosti (střihová rychlost). Subjekty s hyperviskózním syndromem mohou být prezentovány buď fokální neurologickou dysfunkcí, nebo difúzními nebo multifokálními znaky nebo symptomy, zahrnujícími bolest hlavy, vizuální poruchy, kognitivní zhoršení nebo záchvaty.

Ve tvorbě a lýzi sraženin je zahrnuto mnoho substancí. Plasminogen, známý také jako glu-plasminogen, a plasmin jsou dvě primární substance zahrnuté v lýzi.

Plasminogen je protein složený ze 791 aminokyselin, který cirkuluje v lidské plasmě v koncentraci asi 200 µg/ml. Plasminogen je zymogenová forma fibrinolytického enzymu, plasminu, který má širokou substrátovou specifitu a je bezprostředně odpovědný za degradaci krevních sraženin. Z největší části je proteolýza fibrinu zprostředkována generací plasminu ve fibrinové sraženině z plasminogenu, zachyceného ve sraženině. Fredenburgh a Nesheim, J. Biol. Chem. 267: 26150-56 (1992).

Plasminogen má pět okrajových domén ve svém regionu aminoterminálního těžkého řetězce, které vykazují lysin vázající místa pro rozpoznávání lysinových zbytků ve fibrinu. Konverze

plasminogen-plasmin, jak ve sraženině tak na jejím povrchu, je usnadněna afinitou tkáňového plasminogenového aktivátoru ("t-PA") pro fibrin, která vede k fibrin dependentní t-PA-indukované plasminogenové aktivaci. Fredenburgh, loc. cit.

- 5 Je-li iniciována, vede fibrinolýza k několika pozitivním zpětně působícím reakcím. Například plasminem katalyzované štěpení fibrinu generuje karboxy-terminální lysinové zbytky, které naopak poskytují další vazebná místa jak pro t-PA a plasminogen. Tak také usnadňuje plasminem katalyzovanou konverzi glu-plasminogenu na lys-plasminogen specifickým štěpením, které je předaktivačním stupněm. Shih a Hajjar, P.S.E.B.M. 202: 258-64 (1993).
- 10 V literatuře výraz "lys-plasminogen" se vztahuje k formám plasminogenu, kde je N-terminální aminokyselinou lysin, valin nebo methionin. Nieuwenhuizen a kol., Eur. J. Biochem. 174: 163-69 (1988). Konverzní aktivita působí pozitivní zpětně působící reakci, protože lys-plasminogen výrazně lepší substrát než glu-plasminogen jak pro t-PA tak urokinasu, která může být vyvolána zvýšenou afinitou lys-plasminogenu k fibrinu. Poměr K_{cat}/K_m pro t-PA katalyzovanou aktivaci
- 15 lys-plasminogenu převyšuje tentýž poměr pro glu-plasminogen asi desetkrát. Fredenburgh, loc. cit.

- Fibrinolýza byla již dříve shledána jako urychlovaná přidavkem lys-plasminogenu in vivo a in vitro. Dále při porovnání použití exogenního lys-plasminogenu s použitím exogenního glu-plasminogenu ve stejných experimentech, produkuje 0,08 μmol lys-plasminogenu stejný stupeň
- 20 zvýšené fibrinolýzy jako 0,67 μmol glu-plasminogenu. Tak i když obě formy plasminogenu zkracují dobu fibrinolýzy, lys-plasminogen je asi osmkrát více potentní z tohoto hlediska než glu-plasminogen. Viz Fredenburgh, supra.

- 25 Předěšlé studie lys-plasminogenu neudávají použití tohoto proteinu při léčbě reperfučního poškození. Obvyklým ošetřením reperfučního poškození je flunarizin, který je pouze účinný tehdy, je-li podáván profylakticky.

30 Podstata vynálezu

Předmětem vynálezu je použití lys-plasminogenu pro přípravu farmaceutické kompozice pro ošetření reperfučního poškození a pro zlepšení mikrocirkulace.

- 35 Zejména je předmětem vynálezu použití uvedené látky pro přípravu farmaceutické kompozice pro ošetření ischemie a doprovodného reperfučního poškození, reperfučního poškození po ischemické příhodě, poškození tkáně po reperfuzi a poškození mozku po reperfuzi, zvláště je-li reperfuční poškození důsledkem mrtvice, infarktu nebo chirurgického zákroku.

- 40 Uvedená farmaceutická kompozice je vhodná i pro ošetření cerebrální ischemie a transitorních ischemických ataků.

- Dále je taková farmaceutická kompozice vhodná pro prevenci reperfučního poškození u pacientů, přijímajících transplantovanou tkáň nebo orgán, a pro ošetřování reperfučního poškození
- 45 u dárce tkáně nebo orgánu.

Uvedená farmaceutická kompozice obsahuje zejména 10 až 1000 CU lys-plasminogenu na kg subjektu, zvláště 100 až 600 CU lys-plasminogenu na kg subjektu, například 500 CU lys-plasminogenu na kg subjektu.

- 50 Předložený vynález umožňuje léčbu ischemické příhody, včetně cerebrální ischemie a reperfučního poškození spojeného s ischemickou příhodou. Dále poskytuje předložený vynález léčbu ischemické příhody způsobem, který vylučuje nebo minimalizuje nežádoucí účinky

spojené s konvenčními léčbami, jako je reperfuze poškození. Výraz "ošetřování" ve svých mnoha gramatických formách označuje prevenci, zmírnění, minimalizaci nebo léčbu chorob nebo jiných nežádoucích stavů.

- 5 Bylo objeveno, že plasmin a plasmin tvořící proteiny, kategorie, která zahrnuje lys-plasminogen, pre-aktivovaný zymogen plasminu, mohou být použity v souladu s předloženým vynálezem pro zeslabení nebo vyloučení reperfuze poškození následujícího po ischemické příhodě. Tohoto zlepšujícího účinku lze dosáhnout i tehdy, když již reperfuze započala.
- 10 Lys-plasminogen samotný může být použit jako léčba. Všechny formy plasminogenu jsou považovány za vhodné pro použití podle vynálezu pokud si udržují schopnost působit zlepšení popsaná dříve. Pro použití podle vynálezu jsou také vhodné fragmenty lys-plasminogenu a varianty lys-plasminogenu, jako jsou analoga, deriváty, muteiny a napodobeniny přirozené molekuly, které se udržují schopnost působit výše popsaná zlepšení.
- 15 Fragmenty lys-plasminogenu označují části aminokyselinové sekvence lys-plasminogenového polypeptidu. Tyto fragmenty mohou být generovány přímo z lys-plasminogenu samotného chemickým štěpením, trávením proteolytickými enzymy nebo jejich kombinacemi. Dále mohou být takové fragmenty vytvořena rekombinantními technikami za použití genom nebo cDNA klonujících metod. Dále existují metody syntézy polypeptidů přímo z aminokyselinových zbytků.
- 20 Varianty lys-plasminogenu mohou být produkovány těmito a jinými metodami. Mohou být použity techniky místně specifické a region-řízené mutagenese. Viz CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, vol. 1, kap. 8 (Ausubel a spol., vyd., J. Wiley and Sons 1989 and Supp. 190-93); PROTEIN ENGINEERING (Oxender and Fox eds., A. Liss, Inc. 1987). Dále mohou být pro mutagenesi použity techniky linker-scanningu a PCR. Viz PCR TECHNOLOGY (Erllich ed., Stockton Press 1989); CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, vol. 1 a 2, supra. Nepeptidové sloučeniny, které napodobují vazbu a funkci peptidu ("mimetika") mohou být produkovány postupem podle práce Saragovi a spol., Science 253: 792-95 (1991). Sekvencování proteinu, struktura a modelování přiblížení pro použití jakoukoliv z výše
- 25 popsaných technik jsou popisovány v PROTEIN ENGINEERING, loc. cit. a CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, vol. 1 a 2, supra.
- 30

- Jakmile je získán požadovaný fragment nebo varianta lys-plasminogenu, mohou být zde popsané techniky použity pro stanovení, který fragment nebo varianta je účinný pro výše uvedené terapie,
- 35 jako je léčba reperfuze poškození a je-li tomu tak, pro stanovení vhodného dávkového rozsahu. Model kryší mrtvice popsaný v dále uvedených příkladech je jednoduchý a představuje levnou cestu pro provedení těchto testů in vivo.

- Předložený vynález se také týká použití progenitorů lys-plasminogenu, to jest, prekurzorů lys-plasminogenu jakož i substancí, které působí na lys-plasminogenový prekurzor pro generování lys-plasminogenu. Ilustrativním lys-plasminogenovým progenitorem je glu-plasminogen, který se štěpí vhodnou proteásou pro generování lys-plasminogenu. Substancí působící takové proteolytické štěpení je plasmin, jehož použití spadá do rozsahu tohoto vynálezu jak bylo uvedeno dříve. Takový kryší model mrtvice je také vhodný pro hodnocení účinnosti lys-plasminogenových progenitorů.
- 40
- 45

- Lys-plasminogen může být získán proteolytickým štěpením glu-plasminogenu pro odstranění aminokyselinových sekvencí z glu-plasminogenu. Způsoby produkce lys-plasminogenu jsou popsány podrobněji v evropské přihlášce 0353 218. Viz také Neuwenhuizen, supra.
- 50

Příklad uvedený dále demonstruje dosud neznámý účinek lys-plasminogenu, který implikuje jeho účinnost a účinnost lys-plasminogenových variant a progenitorů jakož i plasminu a plasmin tvořících proteinů, při léčbě reperfuze poškození. Dosud bylo o lys-plasminogenu pouze známo, že působí při fibrinolýze. Je neočekávané, že plasmin nebo plasmin tvořící protein, jako

je lys-plasminogen, by měly umožňovat překonání bariéry krev-mozek, což bylo předpokládáno jako nezbytné pro působení na místě cerebrální ischemické příhody.

Existuje i jiné použití lys-plasminogenu. Lys-plasminogen je nápomocný při léčbě subjektů po srdeční zástavě. Podání lys-plasminogenu může chránit před ischemickým poškozením neurální buňky. Lys-plasminogen může také být použit při léčení celkové tělesné ischemie (šok), ischemie střev a dolních končetin a pro ochranu orgánů pro transplantaci prevencí ischemie.

Způsoby podání zahrnují ty, které se používají pro léčbu sraženin lýzí a typicky to jsou intravenózní způsoby. Dávka lys-plasminogenu používaná podle vynálezu by měla být založena na hmotnosti subjektu a podání v dávce asi 10 až 1000 kaseinolytických jednotek ("CU")/kg. Výhodně by dávka měla být asi 100 až 600 CU/kg a výhodněji by dávka měla být asi 500 CU/kg. Lys-plasminogen může být podáván během krevní reperfuze, která by se mohla objevit když je lys-plasminogen podáván spolu s konvenčními léčbami sraženin lýzí jako je t-pa. Navíc zlepšujícího účinku lys-plasminogenu může být ještě dosaženo, jestliže se podává poté, kdy začala reperfuze. Výhodně by lys-plasminogen měl být podáván před nebo během asi 30 minut po započetí reperfuze. Lys-plasminogenové varianty a progenitory by měly být podávány v dávkách, které působí stejný účinek jako výše uvedené dávkové rozsahy.

Léčba v souladu s předloženým vynálezem může být uskutečněna výhodně podáním výše popsaných substancí ve formě injikovatelných přípravků. Typicky přípravek pro takový účel zahrnuje farmaceuticky přijatelný nosič. Příkladem kompozice v tomto kontextu je vehikulum lys-plasminogenového pufru (9 g/l NaCl, 1 g/l Na₃citrátu.2H₂O, 3 g/l L-lysinu, 6 g/l NaH₂PO₄.2H₂O a 40,000 KIU/l aprotoninu). Farmaceuticky přijatelné nosiče v tomto kontextu zahrnují jiné vodné roztoky, netoxické přísady, zahrnující soli, ochranné látky, pufrы a podobně, jak jsou popsány v REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 15. vyd., Easton: Mack Publishing Co., str. 1405-1412 a 1461-1487 (1975) a v THE NATIONAL FORMULARY XIV., 14. vyd., Washington: American Pharmaceutical Association (1975), jejichž obsahy jsou zde zahrnuty jako reference. Příklady nevodných rozpouštědel jsou propylenglykol, polyethylen-glykol, rostlinný olej a injikovatelné organické estery jako je ethyloléat. Vodné nosiče zahrnují vodu, alkoholické/vodné roztoky, salinické roztoky, parenterální vehikula jako je chlorid sodný. Ringerova dextroza atd. Intravenózní vehikula zahrnují kapalně a živné doplňky. Ochranné látky zahrnují antimikrobiální, antioxidační, chelatační činidla a inertní plyny, pH a přesná koncentrace různých složek ve vazebné kompozici jsou upraveny způsobem rutinním pro odborníky v oboru. Viz GOODMAN AND GILMAN'S THE PHARMACOLOGICAL BASIS FOR THERAPEUTICS (7. vyd.).

Přehled obrázků na výkresech

40

Obr. 1 představuje systém hodnocení použitý při neurologických defektech.

Obr. 2 je souhrnem experimentálních údajů za použití krysiho modelu pro hodnocení terapeutického přínosu lys-plasminogenu ve srovnání s kontrolou.

45

Obr. 3 je grafickým znázorněním hodnot z řízeného experimentu hodnocení účinku lys-plasminogenu na obsah mozkové vlhkosti (edém) u krys s indukovanou ischemií. "A" je krysa s chirurgicky indukovanou ischemií, která dostávala 500 j/kg lys-plasminogenu i.v. s krevní reperfuzí; "B" je krysa s chirurgicky indukovanou ischemií, která dostávala 1,0 ml/kg isotonického salinického roztoku i.v. s krevní reperfuzí, a "C" jsou krysy po simulované operaci, dostávající 1,0 ml/kg isotonického salinického roztoku i.v. (ΔAB : $p < 0,001$, ΔBC : $p < 0,01$, ΔAC : $p < 0,05$).

50

- Obr. 4 je grafickým znázorněním hodnot z experimentu hodnocení vlivu pufru na obsah mozkové vlhkosti (edém) u krys s indukovanou ischemií, který slouží jako další kontrola experimentu na obr. 3. "A" je krysa s chirurgicky indukovanou ischemií, dostávající 1,0 ml/kg pufru i.v. s krevní reperfuzí (n = 7); "B" je krysa s chirurgicky indukovanou ischemií, dostávající 1,0 ml/kg isotonického salinického roztoku i.v. s krevní reperfuzí (n = 7) a "C" je krysa po simulované operaci, dostávající 1,0 ml/kg isotonického salinického roztoku i.v. (n = 8). (Δ AB n.s., Δ BC: $p < 0,01$, Δ AC: $p < 0,01$).
- Obr. 5 je grafickým znázorněním hodnot z řízeného experimentu hodnocení vlivu lys-plasminogenu na neurologický deficit krys s indukovanou ischemií. Celkové hodnocení je založeno na individuálních hodnoceních stavu vědomí, držení těla, svalového tonu a performance (průměr 3 dnů na zvíře). Maximální skóre je 54 (n = 10 na skupinu). "A" je krysa s chirurgicky indukovanou ischemií, dostávající 500 j/kg lys-plasminogenu i.v. s krevní reperfuzí, "B" je krysa s chirurgicky indukovanou ischemií, dostávající 1,0 ml/kg isotonického salinického roztoku i.v. s krevní reperfuzí a "C" je krysa se simulovanou operací, dostávající 1,0 ml/kg isotonického salinického roztoku i.v. (Δ AB: $p < 0,001$, Δ BC: $p < 0,001$, Δ AC: $p = 0,05$).
- Obr. 6 je grafickým znázorněním hodnot z experimentu hodnocení vlivu pufru na neurologický deficit krys s indukovanou ischemií, který slouží jako další kontrola experimentu z obr. 5. Celkové skóre je založeno na individuálních hodnoceních stavu vědomí, držení těla, svalového tonu a performance (průměr 3 dnů na zvíře). Maximální skóre je 54 (n = 6 na skupinu). "A" je krysa s chirurgicky indukovanou ischemií, dostávající 1,0 ml/kg pufru i.v. s krevní reperfuzí, "B" je krysa s chirurgicky indukovanou ischemií, dostávající 1,0 ml/kg isotonického salinického roztoku i.v. s krevní reperfuzí a "C" je krysa po stimulované chirurgické operaci, dostávající 1,0 ml/kg isotonického salinického roztoku i.v. (Δ AB: n.s., Δ BC: $p < 0,01$, Δ AC: $p < 0,01$).

30 Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

35 Vliv lys-plasminogenu na následné choroby cerebrální ischemie u krys

V této experimentální sérii byly hodnoceny vlivy lys-plasminogenu na následné choroby pokusně indukované ischemie u krys. Pro hodnocení neurologických následků ischemie byly použity dva způsoby. Ischemie u krys byla indukována jak je popsáno dále.

- Nejprve se samci krys Sprague-Dawley (hmotnost 300 - 400 g) anestetizují 350 mg/kg chloralhydrátu i.p. a do jugulární vény se zasune katetr. Pět mililitrů krve se odebere jugulárním katrem (100 m.j. heparinu ve stříkačce) za účelem snížení průměrného arteriálního krevního tlaku na 50 mm Hg. Zpřístupní se preparované arterie carotis a uzavřou se současně s odběrem krve. Svorky se odstraní po 30 minutách a odebraná krev je znovu infundována (reperfuze). Na rány se aplikuje fibrinové utěšňovadlo (Tisseel®). Zvířata se udržují pod anestézi celkem 24 hodin (23,5 h po reperfuzi). Po navrácení k bdělému stavu prochází každé ze zvířat jedním z následujících postupů:

Hodnocení edému mozku:

5 Zvířata se udržují při konstantní tělesné teplotě po celkem 24 hodiny, usmrtí se etherem a vyjmou se mozky. Hodnocení edému mozku bylo provedeno za použití modifikací metod publikovaných pro jiné druhy. Oh a Betz, Stroke 22: 915-21 (1991).

10 Obsah vlhkosti, který je vynikajícím parametrem pro hodnocení edému mozku, indukovaného ischemií/reperfuzí, se stanoví následovně: Zváží se obě hemisféry, suší se 17 hodin při 200 °C a znovu se zváží. Obsah vlhkosti se vypočte v procentech celkové hmotnosti vlhkosti podle následujícího vzorce:

$$\frac{\text{vlhká hmotnost} - \text{suchá hmotnost}}{\text{vlhká hmotnost}} \times 100$$

15

Hodnocení neurologických deficitů:

20 U zvířat se hodnotí neurologické deficity první, druhý a třetí pooperační den. Wauquier a spol., Neuropharmacology 28: 837-46 (1989). Byly hodnoceny stav bdělosti, držení těla, svalový tonus, pokus s vysutým žebříkem o sklonu 45° a pokus s vertikálně se otáčejícím, rotačním diskem, na základě systému hodnocení uvedeného na obr. 1. Spočte se kumulativní skóre pro tři dny (maximální skóre = 54).

25 Lys-plasminogen (IMMUNO AG) byl podáván intravenózně pomocí katetru buď do jugulární, nebo ocasní vény. Tato podání byla uskutečněna ve zvýšených koncentracích v různých časech. Ischemická zvířata ošetřená isotonickým salinickým roztokem slouží jako pozitivní kontroly, zatímco zvířata podrobená simulované operaci a ošetřovaná isotonickým salinickým roztokem slouží jako negativní kontroly.

30 Výše popsaný lys-plasminogenový pufr byl testován za použití každého z těchto postupů v separátních experimentech. Součet dávky, režim podání, experimentální postupy a výsledky jsou uvedeny na obr. 2.

35 Výsledky pro 500 CU/kg lys-plasminogenu (a pufru, použitého jako kontrola) jsou uvedeny na obr. 3 a 4 pro edém a obr. 5 a 6 pro neurologické deficity. Významné hodnoty jsou založeny na t-testech pro edém a Kruskal-Wallisově testu, zahrnujícím "chi-square" distribuci neurologických deficitů.

40 Dávka 500 CU/kg lys-plasminogenu ukazuje významný ochranný účinek na následky experimentálně indukované cerebrální ischemie u krys. Režim podání nehraje podstatnou úlohu. Je třeba uvést, že lys-plasminogen ještě poskytuje ochranný účinek i když byl podán 30 minut po počátku reperfuze. Toto je v rozporu s výsledky získanými pro standardní terapeutické měření flunarizinu, který je kalciovým antagonistou používaným v klinické praxi. Flunarizin (0,63 mg/kg podaný intravenózně) byl účinný, jestliže byl podán v reperfundované krvi, ale
45 neměl žádný účinek, byl-li podán 30 minut po reperfuzi (údaje neuvedeny).

Lys-plasminogen (500 CU/kg) byl schopen reverze účinků cerebrální ischemie podle hodnocení mozkového edému a neurologických deficitů na krysím modelu experimentální ischemie. Pufr použitý v lys-plasminogenovém přípravku neměl žádný účinek. Na rozdíl od standardního terapeutického měření (flunarizin), byl lys-plasminogen účinný i když byl podán 30 minut po
50 reperfuzi.

Příklad 2

5 Vliv lys-plasminogenu na chirurgické postupy

Chirurgické postupy typicky zahrnují přerušení krevního toku k určitým orgánům nebo tkáním, které je obvykle způsobeno svorkováním. Takové přerušení krevního toku k orgánu nebo tkáni působí vývoj ischemického stavu v orgánu nebo tkáni, který následně vede k reperfuznímu poškození, jakmile je obnoven krevní tok. Tento ischemický stav a následné reperfuzní poškození je zvláště problematické v chirurgických procedurách, které zahrnují transplantaci orgánů nebo tkání příjemci.

Transplantace zahrnují prodlouženou dobu svorkování orgánu nebo tkáně, které mají být transplantovány, zejména když se používají orgány nebo tkáně allogenních nebo xenogenních dárců. Toto svorkování vyvolává přerušení krevního toku orgánem nebo tkání, které je následováno odstraněním orgánu nebo tkáně z dárce. Svorkování a odstranění vyvolává ischemii v transplantovaném orgánu nebo tkáni. Obnovení krevního toku do transplantovaného orgánu nebo tkáně během dokončení postupu bude vyvolávat reperfuzní poškození, objevující se v orgánu nebo tkáni jakož i okolních orgánech a tkáních příjemce. V situaci podobné transplantacím ledvin, kdy dárce často je a zůstává naživu, by tělesná plocha dárce, obklopující odstraněnou ledvinu, měla být také chráněna proti ischemii a reperfuznímu poškození.

V souladu s předloženým vynálezem, ischemické podmínky a následné reperfuzní poškození způsobené chirurgickými procedurami může být léčeno nebo mu být zabráněno pomocí proteinů, majících účinek lys-plasminogenu nebo progenitorů lys-plasminogenu. Takové proteiny mohou mít i kladný vliv na transplantované orgány dárce nebo na takové tkáně, jakož i na okolní orgány a tkáně dárce a příjemce. Podání proteinů, majících účinek lys-plasminogenu nebo progenitorů lys-plasminogenu umožňuje orgánům a tkáním tolerovat prodloužené periody ischemie jakož i fyziologický stres způsobený reperfuzí.

Poškození orgánu nebo tkáně může být sníženo nebo mu může být zabráněno společným podáním proteinů, majících účinek lys-plasminogenu nebo progenitorů lys-plasminogenu před započatím chirurgického výkonu. V případě transplantací mohou být proteiny podle předloženého vynálezu podávány dárci před odebráním orgánu nebo tkáně. Dárce může být ošetřován systémově nebo lokálně do arterie zásobující orgán nebo tkáň před odebráním orgánu nebo tkáně. Podobně může být příjemce orgánu nebo tkáně ošetřován před transplantací za účelem ochrany orgánů a tkáně, obklopující transplantační plochu jakož i orgánu nebo tkáně, která má být umístěna do příjemce. Proteiny, mající účinek lys-plasminogenu nebo progenitorů lys-plasminogenu mohou také být podávány během reperfuze nebo po ní.

Výhodně se lys-plasminogen podává pro ošetření reperfuzního poškození. Účinná dávka lys-plasminogenu pro systémové podání by měla být v rozmezí od 10 do 1000 CU/kg. Výhodně by dávka měla být asi 100 až 600 CU/kg a výhodněji by dávka měla být asi 500 CU/kg. Při použití lokálního podání by dávka měla být vypočtena přiblížením se k systémovým dávkám popsaným výše v ošetřované ploše.

Je třeba uvést, že popis, obrázky a specifické příklady, které popisují výhodná provedení vynálezu jsou zde uvedeny pouze pro ilustraci a nejsou míněny jako omezující. Různé změny a modifikace v duchu a rozsahu vynálezu budou zřejmé odborníkům v oboru ze zde uvedeného popisu.

PATENTOVÉ NÁROKY

5

1. Použití lys-plasminogenu pro přípravu farmaceutické kompozice pro ošetření reperfuzního poškození a pro zlepšení mikrocirkulace.

10

2. Použití podle nároku 1 pro ošetření ischemie a doprovodného reperfuzního poškození, reperfuzního poškození po ischemické příhodě, poškození tkáně po reperfuzi a poškození mozku po reperfuzi.

3. Použití podle nároku 1, kde reperfuzní poškození je důsledkem mrtvice.

15

4. Použití podle nároku 1, kde reperfuzní poškození je důsledkem infarktu.

5. Použití podle nároku 1, kde reperfuzní poškození je důsledkem chirurgického zákroku.

20

6. Použití podle nároku 1, kde uvedená farmaceutická kompozice je pro ošetření cerebrální ischemie.

7. Použití podle nároku 1, kde uvedená farmaceutická kompozice je pro ošetření transitorních ischemických ataků.

25

8. Použití podle nároku 1, kde uvedená farmaceutická kompozice je pro prevenci reperfuzního poškození u pacientů, přijímajících transplantovanou tkáň nebo orgán.

9. Použití podle nároku 1 pro výrobu farmaceutické kompozice pro ošetřování reperfuzního poškození u dárce tkáně nebo orgánu.

30

10. Použití podle nároku 1, kde uvedená farmaceutická kompozice obsahuje 10 až 1000 CU lys-plasminogenu na kg subjektu.

35

11. Použití podle nároku 10, kde uvedená farmaceutická kompozice obsahuje 100 až 600 CU lys-plasminogenu na kg subjektu.

12. Použití podle nároku 11, kde uvedená farmaceutická kompozice obsahuje 500 CU lys-plasminogenu na kg subjektu.

40

7 výkresů

Obr. 1

Bodovací systém pro hodnocení neurologických deficitů

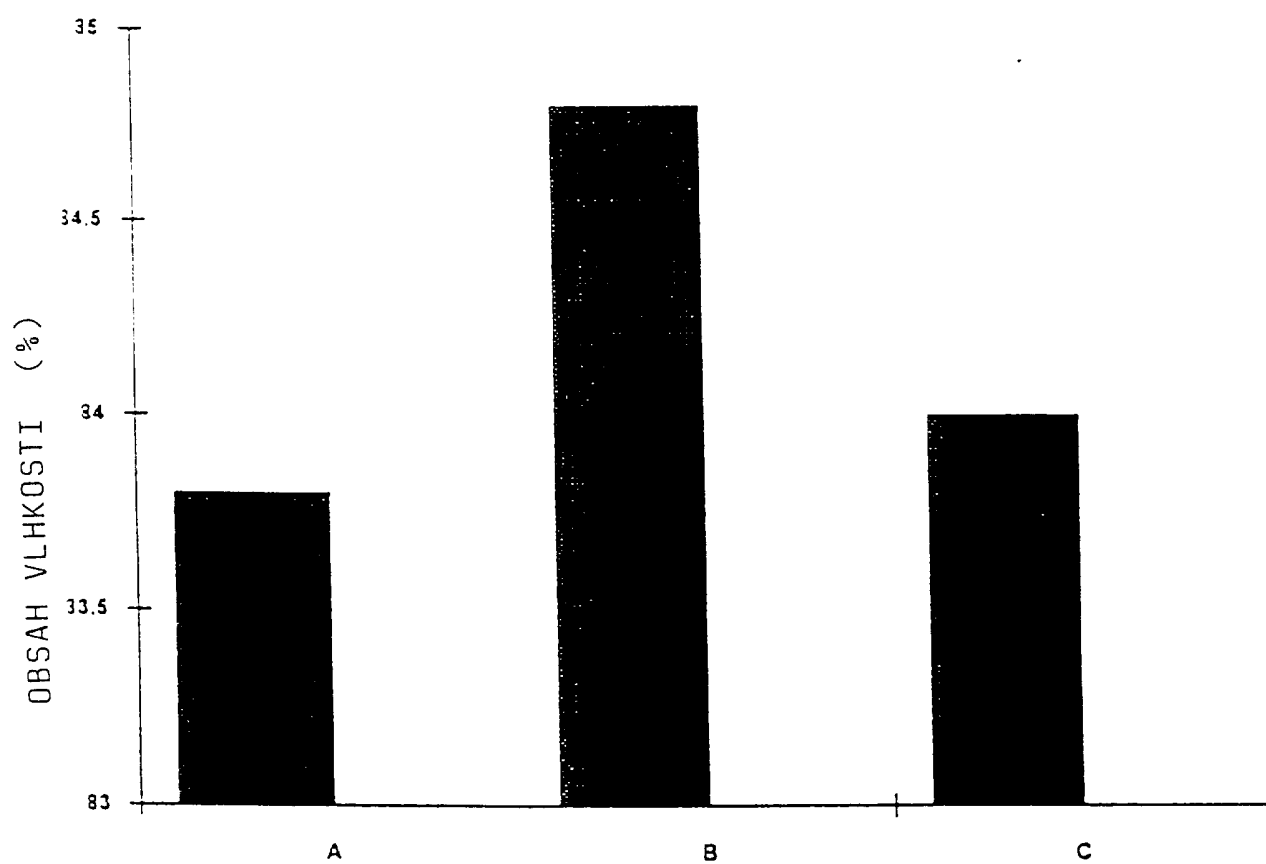
	Popis	skóre
stav bdělosti	normální	0
	zbytkový	1
	apatický	2
	omámený	3
	záchvat	4
držení těla	normální	0
	napjaté tlapy	1
	otáčení	2
	hypomotilita	3
	neschopné stát	4
vysunutý žebřík (45°):	šplhání až visení po 5 s	0
	a natahování zadních noh	1
	visení po 5 s	2
	visení 5 s	3
	žádný uchopovací reflex	4
vertikální, rotační disk:	odolává rotaci o 180° po 5s	
	odolává rotaci o 180° po 5 s	1
	udrží se jen do 90°	2
	neudrží se	3
svalový tonus	normální	0
	slabý	1
skóre celkem:		16
smrt(s výjimkou způsobenou operací)		18

Obr.2 Souhrn hodnocení intravenosního Lys-plasminogenu a pufru použitím krysího "modelu mrtvice"

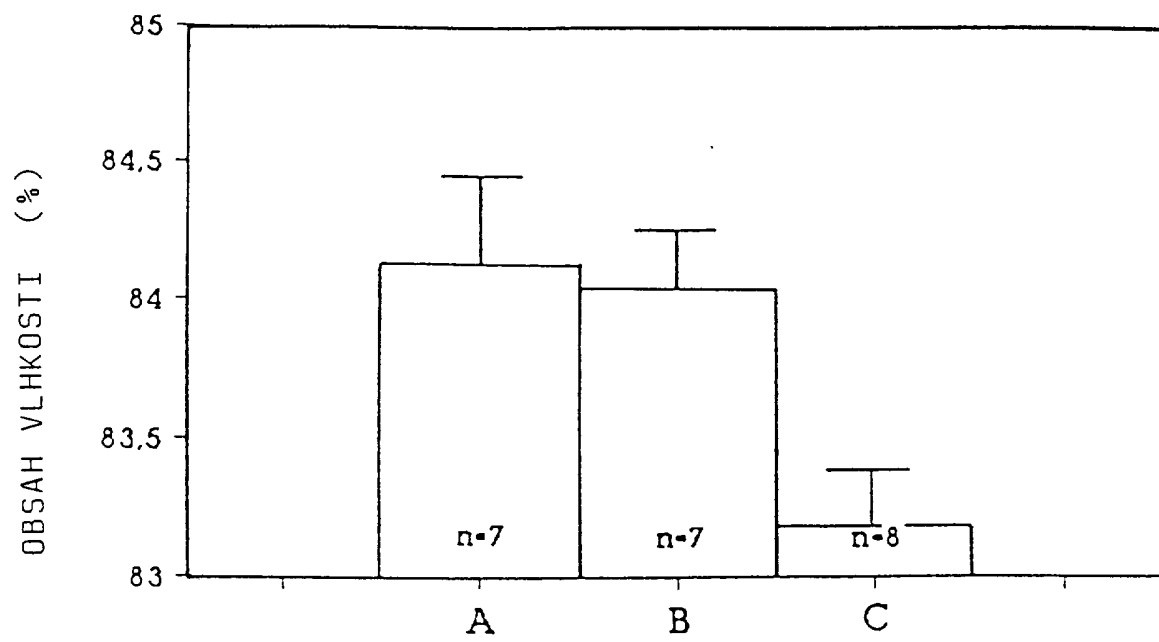
Substance dávka/kg	podání	postup (n zvířat)	výsledky
lys-plasminogen 200 CU	s krevní reperfuzí	edém (3 skupiny, n= 9 nebo 10 zvířat každá)	trend k chránícímu efektu, nevýznamný ^x
lys-plasminogen 250 CU	15 min před ischemií	edém (3 skupiny, n= 15 nebo 17 každá)	žádný efekt
lys-plasminogen 500 CU	před počátkem edém ischemie a 1,5 každá s krevní reperfuzí	(3 skupiny, n= 1,5 každá)	signifikantní chránící účinek
pufrový analog 500 CU	před počátkem edém ischemie a s krevní reperfuzí	(3 skupiny, n= 6 každá)	žádný účinek
lys-plasminogen 500 CU	s krevní re- perfuzí	edém (3 skupiny, n= 6 každá)	signifikantní chránící účinek (viz obr.3)
pufrový analog 500 CU	s krevní reperfuzí	edém (3 skupiny, n=7 nebo 8 každá)	žádný účinek (viz obr.4)

Obr.2 (pokrač.)

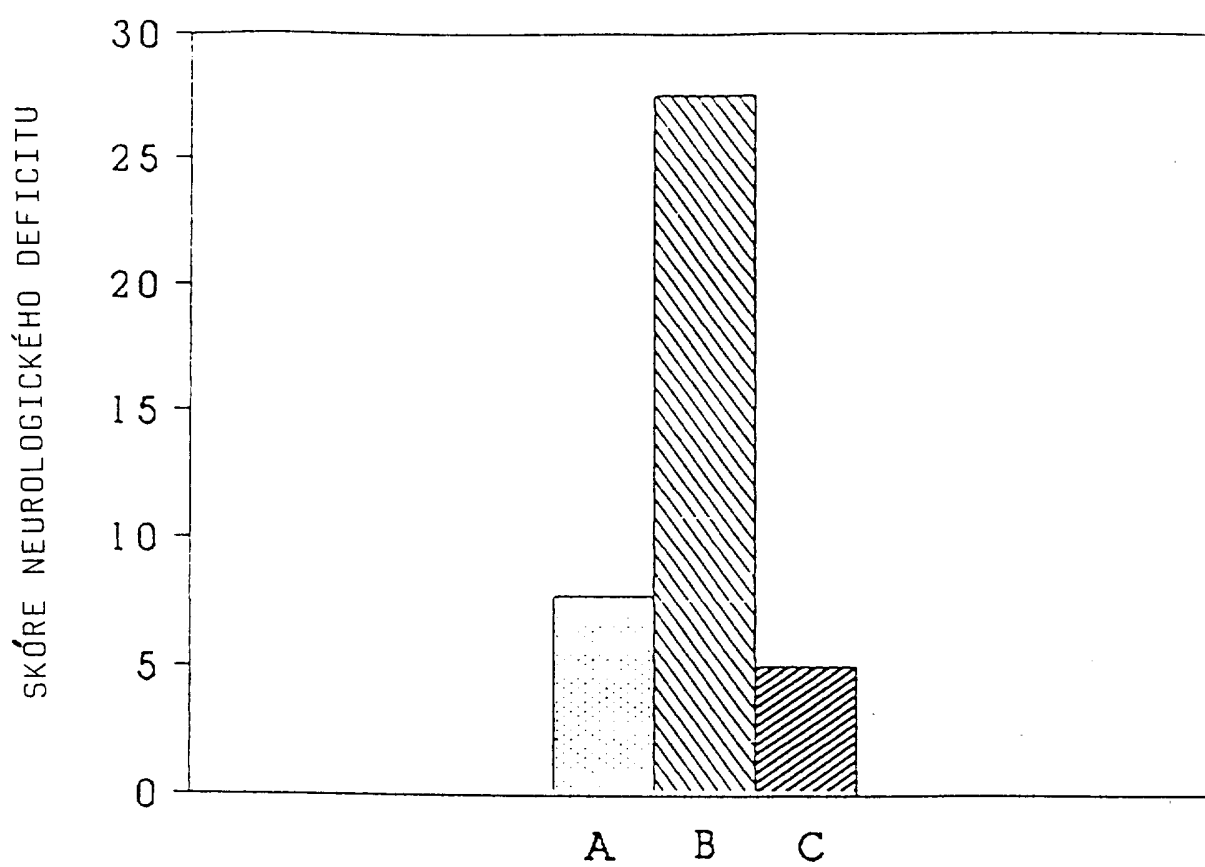
lys-plasminogen 500 CU	s krevní reperfuzí	neurologické deficity (3 skupiny, n=10 každá)	signifikantní chránící účinek (viz obr.5)
pufrový analog 500 CU	s krevní reperfuzí	neurologické deficity (3 skupiny, n=6 každá)	žádný účinek (viz obr.6)
lys-plasminogen 500 CU	30 min po krevní	edém (3 skupiny, n= 8 nebo 9 každá)	signifikantní chránící účinek
lys-plasminogen 500 CU	60 min po krevní reperfuzi	edém (3 skupiny, n= 5 nebo 6 každá)	žádný účinek



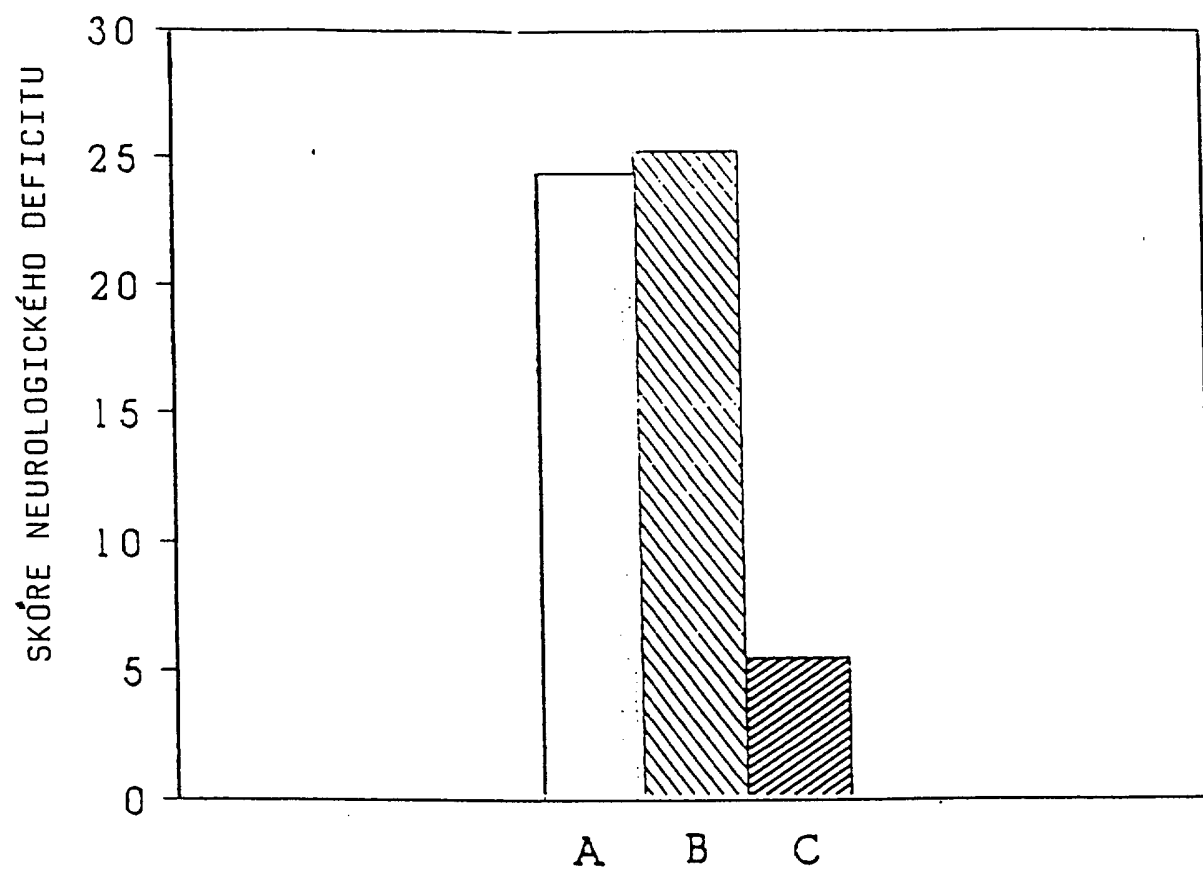
Obr. 3



Obr. 4



Obr. 5



Obr. 6

Konec dokumentu
